

## Оценка влияния антибиотиков на развитие экспериментального блеомицинового пневмофиброза

НИИ пульмонологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Санкт-Петербург

L.N.Novikova, E.S.Lebedeva, I.V.Dvorakovskaya, T.V.Zakoldaeva, L.N.Danilov

## Investigation of effects of antibiotics on experimental bleomycin-induced pulmonary fibrosis

### Summary

Several reports have shown results of antifibrotic action of antibiotics in experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Effects of antibiotics on course of IPF has been also investigated in the present work. IPF model was created in male rats Vistar ( $n = 41$ ) using intratracheal instillations of bleomycin 10 mg/kg followed by intramuscular injections of cefotaxime ( $n = 10$ ) or erythromycin ( $n = 10$ ) after the 5th day during 8 days. We evaluated bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell count and differentiation, oxidative activity of alveolar macrophages (AM) using luminol-dependent chemiluminescence, and histological changes in the lung tissue. Both the antimicrobials decreased total cell count in BALF, increased AM and lymphocyte numbers and decreased neutrophil number. Erythromycin increased oxidative activity of AM and cefotaxime reduced it in some degree. Structure of the lung tissue after 14 days of administration of antibiotics did not differ from that seen in rats received bleomycin alone but the formers had more severe vascular lesions such as vasculitis, perivascular fibrosis, full-blooded capillaries. Therefore, antibiotics inhibited neutrophil-related inflammation, heterogeneously affected oxidative activity of AM, caused vascular lesions and did not influence fibrosis. These results do not suggest antibiotics to be used as therapeutic drugs in IPF.

### Резюме

В ряде публикаций представлены результаты применения антибиотиков в качестве антифибротического средства на экспериментальной модели идиопатического фиброзирующего альвеолита (ИФА). В данной работе оценивали влияние антибиотиков на развитие ИФА в эксперименте, модель которого создавалась у крыс-самцов линии Вистар ( $n = 41$ ) при внутритрахеальном введении 10 мг/кг блеомицина. В течение 8 дней начиная с 5-го дня после инстилляций блеомицина животным вводили внутримышечно цефотаксим ( $n = 10$ ) либо эритромицин ( $n = 10$ ). Оценивали цитологию жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), оксидативную активность альвеолярных макрофагов (АМ) при люминолзависимой хемилюминесценции и проводили гистологическое исследование легочной ткани. Применение обоих антибиотиков приводило к уменьшению общего количества клеток и увеличению числа АМ, снижению числа нейтрофилов и повышению содержания лимфоцитов. Оксидативная функция АМ при применении эритромицина активировалась, а при применении цефотаксима, напротив, несколько снижалась. Морфологическая картина легких через 14 дней применения цефотаксима и эритромицина практически не отличалась от той, которая наблюдалась после введения только блеомицина, за исключением более выраженных на фоне применения антибиотиков сосудистых изменений: полнокровия капилляров, васкулитов, периваскулярного фиброза. Таким образом, антибиотики при фиброзирующем альвеолите подавляют нейтрофильный компонент воспаления, неоднозначно влияют на оксидативную активность АМ и вызывают сосудистые повреждения, не оказывая влияния на развитие фиброза, что не позволяет рекомендовать их в качестве лечебного средства при ИФА.

Идиопатический фиброзирующий альвеолит (ИФА) представляет собой патологический процесс неясной природы, который характеризуется развитием небактериального воспаления, ведущего к прогрессирующему интерстициальному фиброзу и нарастающей дыхательной недостаточности [1]. В большинстве случаев прогноз ИФА неблагоприятный. Продолжительность жизни больных ИФА составляет в среднем около пяти лет [2, 3]. В ряде случаев неблагоприятный прогноз заболевания обусловлен поздней диагностикой вследствие врачебных ошибок, которые составляют 82 % [4]. Чаще всего необоснованно диагностируется двусторонняя пневмония, и, как следствие, назначается терапия антибиотиками. Клинические наблюдения свидетельствуют, что длительное лечение антибиотиками пациентов с ИФА ускоряет прогрессирование заболевания и ведет к утяжелению состояния больных.

В ряде публикаций представлены результаты применения антибиотиков в качестве антифиброти-

ческого средства на экспериментальной модели ИФА [5, 6]. Влияние антибиотиков на экспериментальный пневмофиброз оценивали по числу нейтрофилов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), активности нейтрофильной эластазы, содержанию в крови фактора некроза опухоли  $\alpha$ , фактора роста тромбоцитов, интерлейкина-8, а также по результатам морфологического исследования легких. В этих исследованиях было выявлено не только противовоспалительное, но и антифибротическое действие антибиотиков из группы макролидов. Y.J.Li et al. [6] пришли к заключению, что эритромицин уменьшает повреждение легких, вызванное блеомицином, особенно в том случае, когда введение эритромицина предшествует введению блеомицина.

Учитывая противоречивость результатов предшествующих исследований, в настоящей работе предпринята попытка оценить влияние 2 групп антибиотиков на развитие патологического процесса в эксперименте на модели ИФА.

## Материалы и методы

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар ( $n = 41$ ). Модель ИФА создавалась с помощью интратрахеального введения животным блеомицина гидрохлорида (блеомицина) из расчета 10 мг/кг в 0,3 мл стерильного изотонического раствора NaCl. Блеомицин обладает способностью быстро проникать через клеточную мембрану и связывать ион железа с молекулой ДНК. В присутствии кислорода железо, входящее в комплекс "железо(2+)–блеомицин–ДНК", постоянно меняет свою валентность, тем самым запускается цепная реакция образования активных форм кислорода (супероксидных анионов и гидроксильных радикалов), участвующих в повреждении различных структур легких.

Выполнены следующие серии опытов: 1) интратрахеальное введение животным блеомицина ( $n = 11$ ); 2) блеомицин + цефотаксим ( $n = 10$ ); 3) блеомицин + эритромицин ( $n = 10$ ). Исследовано 10 интактных крыс. Антибиотики вводили животным внутримышечно в течение 8 дней, начиная с 5-го дня после инстиляции блеомицина. Доза антибиотиков рассчитывалась исходя из суточной дозы, рекомендованной для взрослого человека, с пересчетом на данный вид лабораторного животного. Интактным животным в течение 8 дней внутримышечно вводили 0,5 мл 0,9%-ного NaCl.

Эвтаназию животных проводили способом цервикальной дислокации на 4-й и 14-й дни после завершения введения антибиотиков, что соответствовало 17-му и 27-му дням от момента инстиляции блеомицина. Бронхоальвеолярный лаваж выполняли на изолированных легких стерильным изотоническим раствором NaCl (37 °C). ЖБАЛ собирали в силиконизированные пробирки и после центрифугирования определяли общее и дифференциальное содержание клеток в 1,0 мл. Оксидативную активность альвеолярных макрофагов оценивали с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [7]. После определения спонтанной ХЛ клеток в реакционные кюветы вносили индуктор оксидативной активности альвеолярных макрофагов — макрофагальный формилловый пептид (формилметил-лейцилфенилаланин — ФМЛФ). В течение 15 мин с помощью хемилюминометра "Клинилюмам" регистрировали процесс выработки альвеолярными макрофагами свободных радикалов (стимулированная ХЛ). Для гистологического исследования

легкие расправляли и фиксировали 10%-ным раствором формалина. Кусочки ткани вырезали из одних и тех же долей у каждой крысы, осуществляли проводку по спиртам возрастающей концентрации, инкубировали в хлороформе и заливали парафином. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по ван Гизону с докраской на эластик фуксилином; также выполнялись PAS-реакция и окраска альтиановым синим.

Статистическую обработку количественных данных проводили с помощью методов вариационной статистики. Достоверность различий средних величин оценивали с помощью критерия Стьюдента.

## Результаты

Клеточный состав ЖБАЛ определяли на 14-й день после завершения введения антибиотиков (табл. 1). При анализе цитограммы было установлено, что применение обоих классов антибиотиков приводило к уменьшению общего количества клеток —  $1,3 \pm 0,1 \times 10^6$  (цефотаксим) и  $0,9 \pm 0,1 \times 10^6$  (эритромицин) по сравнению с животными 1-й серии и увеличению числа альвеолярных макрофагов — соответственно  $59,7 \pm 8,1 \%$  и  $66,5 \pm 6,4 \%$  (в 1-й серии —  $18,0 \pm 1,2 \%$ ;  $p < 0,05$ ). Одним из маркеров активного воспаления в легких является содержание нейтрофилов в ЖБАЛ. Результаты исследования свидетельствовали об уменьшении активности воспалительного процесса в легких при применении антибиотиков. Так, число нейтрофилов при использовании цефотаксима снизилось до  $18,3 \pm 2,7 \%$ , а при применении эритромицина — до  $19,5 \pm 2,1 \%$  (в 1-й серии —  $78,4 \pm 5,7 \%$ ;  $p < 0,05$ ). Следует отметить возрастание содержания лимфоцитов в ЖБАЛ после применения обоих антибиотиков.

Клеточный состав ЖБАЛ во 2-й и 3-й сериях свидетельствовал о том, что применение антибиотиков приводило к снижению аттракции нейтрофилов в легкие. Исследование оксидативной активности макрофагов дополняло представления о процессе киллинговой активности этих клеток (табл. 2). Известно, что пневмотоксикант блеомицин стимулирует оксидативную активность макрофагов, приводящую к повреждению легочных структур. После применения эритромицина отмечалась еще более выраженная активация оксидативной функции альвеолярных макрофагов. Цефотаксим, в отличие от эритромицина, вызывал некоторое угнетение оксидативной активности альвеолярных макрофагов.

**Таблица 1**  
**Цитограмма ЖБАЛ крыс с ИФА на 14-й день после прекращения введения цефотаксима и эритромицина ( $M \pm t$ )**

Группы животных	Цитоз, $\times 10^6$	Альвеолярные макрофаги, %	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %
Здоровые ( $n = 10$ )	$0,62 \pm 0,05^*$	$88,7 \pm 1,7^*$	1–2	$8,6 \pm 0,3$
1-я серия ( $n = 11$ )	$2,31 \pm 0,1$	$18,0 \pm 1,2$	$78,4 \pm 5,7$	$3,1 \pm 0,8$
2-я серия ( $n = 10$ )	$1,3 \pm 0,1^*$	$59,7 \pm 8,1^*$	$18,3 \pm 2,7^*$	$22,4 \pm 2,1^*$
3-я серия ( $n = 10$ )	$0,9 \pm 0,1^*$	$66,5 \pm 6,4^*$	$19,5 \pm 2,1^*$	$14,8 \pm 1,8^*$

Примечание: \* — различие с данными 1-й серии достоверно;  $p < 0,05$ .

**Таблица 2**  
**Окислительная активность альвеолярных макрофагов крыс с ИФА на 14-й день**  
**после прекращения введения цефотаксима и эритромицина ( $M \pm m$ )**

Группы животных	ХЛ спонтанная (мВ)	ХЛ стимулированная (мВ)	
		пик	15-я мин
Здоровые ( $n = 10$ )	$1,1 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,4^*$	$1,8 \pm 0,4^*$
1-я серия ( $n = 11$ )	$2,4 \pm 0,7$	$7,9 \pm 1,2$	$5,4 \pm 0,9$
2-я серия ( $n = 10$ )	$1,3 \pm 0,5$	$4,9 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,8$
3-я серия ( $n = 10$ )	$2,8 \pm 0,8$	$15,1 \pm 1,2^*$	$9,1 \pm 0,9$

Примечание: \* – различие с данными 1-й серии достоверно;  $p < 0,05$ .

Нарушения структуры легких оценивались в каждой серии опытов. При гистологическом исследовании легочной ткани животных 1-й серии (на 17-й день после введения блеомицина) выявлялись распространенный мелкоочаговый фиброз интерстициальной ткани и признаки токсического альвеолита: отек межальвеолярных перегородок, инфильтрация лимфоцитами, плазматическими клетками и гистиоцитами. В утолщенных межальвеолярных перегородках обнаруживались спавшиеся капилляры и расширенные вены.

На 4-й день после завершения курса цефотаксима (2-я серия) в легких сохранялись признаки повреждения, сопоставимые с отмеченными в 1-й серии: мелкоочаговый интерстициальный фиброз с разной степенью зрелости соединительной ткани и более выраженные проявления токсического альвеолита (отек межальвеолярных перегородок, интенсивная инфильтрация лимфоцитами, плазматическими клетками, мононуклеарами, лейкоцитами и тучными клетками). Наряду с этим выявлялись новые повреждения, связанные с применением цефотаксима – кровоизлияния и васкулиты (рис. 1).

У животных 3-й серии в эти же сроки после завершения курса эритромицина гистологическое исследование не выявило существенных отличий от морфологической картины, наблюдавшейся у животных 2-й серии и описанной выше. Также определялся мелкоочаговый распространенный интерстициальный фиброз с клеточной инфильтрацией, но в исследованных участках легких отсутствовали кровоизлияния и реже обнаруживались васкулиты.

Через 27 дней от момента введения блеомицина у животных 1-й серии гистоархитектоника легочной ткани значительно изменялась. Наряду с распро-

страненным интерстициальным, перибронхиальным и периваскулярным фиброзом и клеточной инфильтрацией выявлялись очаги кистозной перестройки легочной ткани с бронхолизацией альвеолярного эпителия. В просветах кист определялись распадающиеся лейкоциты, слизь и слущенный эпителий. В зонах интерстициального фиброза стенки сосудов были утолщены за счет разрастания соединительной ткани (рис. 2).

Морфологическая картина легких на 14-й день после применения цефотаксима и эритромицина (27-й день после введения блеомицина) была практически идентична той, которая наблюдалась после введения блеомицина в 1-й серии опытов. Отличие заключалось лишь в том, что при использовании антибиотиков были более выражены изменения в сосудистом русле: полнокровие капилляров и васкулиты, периваскулярный фиброз.

## Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что антибиотики активно воздействуют на патологический процесс, развивающийся в легких экспериментальных животных после введения блеомицина. После применения антибиотиков в ЖБАЛ крыс уменьшалось количество нейтрофилов. Это может свидетельствовать об угнетении аттракции нейтрофилов из сосудистого русла в легкие, что ведет к усилению повреждения легочных структур. Полученные результаты не противоречат данным литературы [5, 6, 8].

Вопрос о влиянии антибиотиков на окислительную активность альвеолярных макрофагов остается открытым и требует уточнения, т. к. результаты ис-

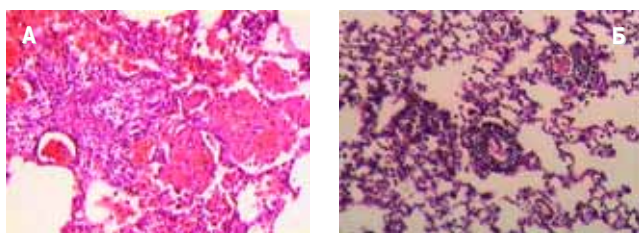


Рис. 1. А – обширные кровоизлияния в легочной ткани, клеточная инфильтрация, организация фибрина в альвеолах; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 180$ . Б – инфильтрация межальвеолярных перегородок лимфоцитами, васкулиты; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 180$

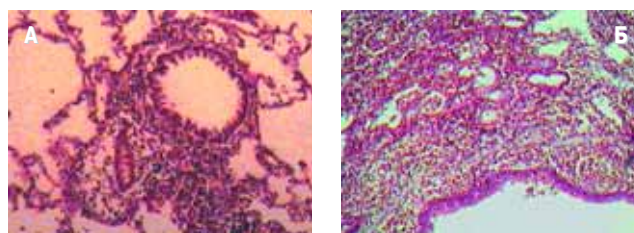


Рис. 2. А – расширение просветов альвеол, перибронхиальная и периваскулярная клеточная инфильтрация; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 180$ . Б – выраженный фиброз, мелкокистозная перестройка легочной ткани, бронхолизация альвеолярного эпителия; окраска гематоксилином и эозином;  $\times 140$

следования показали, что число свободных радикалов, продуцируемых макрофагами, уменьшалось при введении цефотаксима и увеличивалось под влиянием эритромицина, что не согласуется с мнением ряда авторов. Так, *M.T.Labro* [9] сообщает, что одним из механизмов противовоспалительного действия эритромицина является угнетение оксидативной активности фагоцитов.

На основании полученных результатов можно было бы ожидать торможения процесса развития альвеолита и последующего формирования фиброза. Однако данные гистологического исследования легких свидетельствуют о том, что на фоне применения антибиотиков сохранялись и даже становились более выраженными признаки токсического альвеолита. Кроме того, возникали признаки повреждения сосудистого русла легких, которые проявлялись очагами кровоизлияний и признаками васкулита.

Таким образом, на основании результатов функциональных и гистологических исследований можно сделать заключение о том, что при ИФА антибиотики ингибируют нейтрофильный компонент воспаления, неоднозначно действуют на оксидативную активность альвеолярных макрофагов, вызывают сосудистые повреждения, но не оказывают влияния на развитие пневмофиброза. В настоящее время нет достаточных оснований рекомендовать антибиотики в качестве лечебного средства при ИФА. Очевидно, что дальнейшие исследования позволят ответить на этот вопрос.

## Литература

1. *Илькович М.М., Новикова Л.Н.* Идиопатический фиброзирующий альвеолит. В кн.: Илькович М.М., Кокосов А.Н. (ред.). Интерстициальные заболевания легких: Руководство для врачей. СПб.: Нордмедиздат; 2005. 127–183.
2. *Lynch J.P. 3rd., White E., Flaherty K.* Corticosteroids in idiopathic pulmonary fibrosis. *Cur. Opin. Pulm. Med.* 2001; 7 (5): 298–308.
3. *Acharya P.S., Zisman D.A.* Antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Pulm. Med.* 2001; 8 (6): 327–334.
4. *Илькович М.М., Новикова Л.Н.* Идиопатический фиброзирующий альвеолит (Болезнь Хаммена–Рича). В кн.: Илькович М.М. (ред.). Заболевания органов дыхания. СПб.: Нордмедиздат; 1998; т. 2: 117–161.
5. *Fujka M., Ye O., Ouchi H. et al.* Doxycycline attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50 (2): 739–743.
6. *Li Y.J., Azuma A., Usuki J. et al.* Preventive effect of erythromycin on experimental bleomycin-induced acute lung injury in rats. *Thorax* 1998; 53 (3): 186–189.
7. *Cohen M.S., Shirtey P.S., De Chatelet L.R.* Further evaluation of luminol-dependent luminescence in diagnosis of disorders of leucocyte oxidative metabolism: role of myeloperoxidase. *Clin. Chem.* 1983; 29 (3): 513–515.
8. *Dersa J., Padrones S., Manresa F.* Macrolides and lower respiratory tract infections. *Eur. Respir. Monograph "Antibiotics and the Lung"* 2004; 9 (Monograph 28): 78–94.
9. *Labro M.T.* Interaction of antibacterial agents with host respiratory defences. *Eur. Respir. Monograph "Antibiotics and the Lung"* 2004; 9 (Monograph 28): 45–61.

Поступила 01.02.08  
© Коллектив авторов, 2008  
**УДК 616.24-004-02**